

München, 1968

Klinische Untersuchungen

über Inositurie

W. Pieter Kaas



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554020_0075

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

**Klinische Untersuchungen
über Inositurie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
W. Pieter Kaas
aus Bochum

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Professor Dr. A. BERNISMEIER
Correferent:	Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL
Dekan:	Professor Dr. H. SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 1960



MEINEM VATER

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Einleitung	
1) Geschichtliches über die Inositolforschung	7
2) Inositolvorkommen in der Tier- und Pflanzenwelt	8
B. Methodik	11
I) Arbeitsgang bei der aufsteigenden Papierchromatographie	12
II) Die elektrolytische Entsalzung	14
III) Arbeitsgang bei der absteigenden Papierchromatographie	19
C. Ergebnisse	
I) Methodische Untersuchungen	21
a) Berechnung des mittleren Fehlers des Mittelwertes bei der von uns angewandten Methode	21
b) Die Harnauftragmenge	22
II) Klinische Untersuchungen	
1) Einzelurine	23
Untersuchungsergebnisse	
2) Tagesprofile	25
a) Untersuchungsergebnisse	
b) Diskussion	28
3) Inositolbelastungen	31
a) Untersuchungsergebnisse	
b) Diskussion	33
D. Zusammenfassung	35
E. Kurven und graphische Darstellungen	36
F. Literatur	40

A. EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit klinischen Untersuchungen der Inosit-ausscheidung im Harn bei verschiedenen Krankheiten. Um dieses Phänomen recht würdigen zu können, erscheint es notwendig, das bisher Bekannte über die biologische Rolle des Inosits aufzuzeigen.

Der Inosit (Hexaoxyhexahydrobenzol) wurde 1850 von SCHERER in Würzburg bei der Isolierung des Kreatins aus dem Muskelfleisch entdeckt. Forscher, die sich weiter mit diesem Cyclit beschäftigten, kamen zu dem gemeinsamen Ergebnis, dass Inosit in der Tierwelt praktisch ubiquitär verbreitet ist. I. FOLCH und D. W. WOOLLEY isolierten 1942 relativ grosse Mengen aus dem ZNS. 1896 fanden FRÄNKEL und R. TAMBACH Inosit in der Schilddrüse und entdeckten, dass dieses Organ weit reicher an Inosit ist als alle übrigen. Diese Drüse enthält ca. 0,5 % Inosit, während im Gehirn etwa 0,04 %, in den Nieren 0,076 % enthalten sind.

6 Jahre nach der Entdeckung des Inosits hatte CLOETTA den Grundstein für die Untersuchungen auf dem Gebiete der renalen Inositausscheidung gelegt. Der Forscher hatte als erster den Cyclit im Nierengewebe und Blasensteinen gefunden, woraus er auf sein Vorhandensein im Urin geschlossen hatte. Es gelang ihm, Inosit im Urin eines Patienten mit Morbus Brightii nachzuweisen, ebenfalls fand er den Stoff im Diabetikerharn.

Weitere Untersuchungen in den folgenden Jahren, beispielsweise von NEWKOMM, ANDERSON, GREENWALD, WEISS, LEVA, KÜLZ u. a. zeigten, dass die Glukosurie beim Diabetes mellitus häufig mit vermehrter Inositausscheidung verbunden ist.

8 Jahre nach der Entdeckung des Inosits im Harn gab der Franzose N. GALLOIS dem Vorkommen von Inosit im Urin einen Namen. Er schreibt dazu: "Ebenso wie man den Namen Albuminurie und Glukosurie den pathologischen Symptomen gab, die durch das Auftreten von Albuminen oder Glukose gekennzeichnet sind, gab ich den Namen Inositurie einem Krankheitsbild, das dadurch gekennzeichnet ist, dass im Urin eine Substanz auftritt, die mit der Familie der Zucker verwandt ist, und der die Chemiker den Namen Inosit gaben.

Inzwischen versuchten andere Forscher den Inosit physikalisch und chemisch näher zu identifizieren. Dabei fanden sie folgendes: es handelt sich um eine weisse süss-schmeckende Substanz, die trotz ihrer Summenformel $C_6H_{12}O_6$ nicht zu den Kohlenhydraten, sondern auf Grund einer gewissen Anzahl Charakteristika zu den Alkoholen $C_6H_6(OH)_6 \times H_2O$ zu zählen ist.

Schwieriger gestaltete sich die Aufgabe, die Struktur des Inositmoleküls genauer zu bestimmen. 1887 gelang es MAQUENNE, den Inosit durch oxydative Sprengung

des Ringes als Cyclohexanhexol zu definieren, wobei dem m-Inosit unter einer Anzahl von Isomeren die grösste Bedeutung zukommt. Im Jahre 1914 stellten WIELAND und WISHART den Inosit zum erstenmal synthetisch her. Jedoch dauerte es noch 28 Jahre, bis DANGSCHAT und POSTERNAK die Aufstellung der Strukturformel gelang, die auch FISCHER bestätigen konnte.

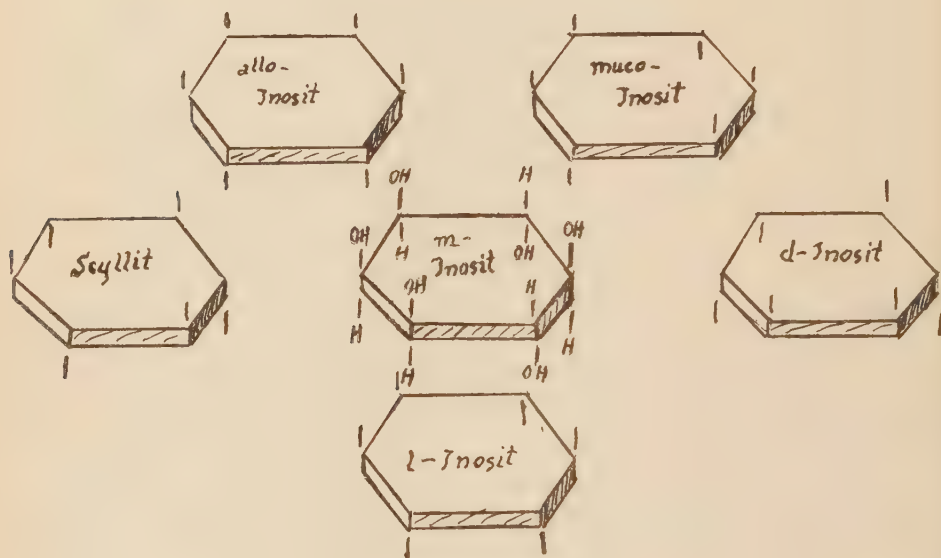


Abbildung 1: meso-Inosit und seine Isomere

Wie W. MARME, MEILLERE, G. TAIRET u. a. durch zahlreiche Untersuchungen beweisen konnten, findet sich der Inosit in der Pflanzenwelt in freier wie in gebundener Form. Vorwiegend trifft man ihn als Phytin, ein Na- Ca-Doppelsalz der Inosithexaphosphorsäure, ferner als Mg- oder K-Verbindung. In besonders reichem Masse kommt der Inosit in jungen Pflanzenschösslingen und in den Früchten vor der Reife vor. Hierbei fällt das Auftreten von Stärke zeitlich mit dem Verschwinden des Inosits zusammen. Auf einen analogen Vorgang stossen wir im Tierreich. Nach Untersuchungen von STARKENSTEIN ist der Inositgehalt beim jungen wachsenden Tier höher als beim erwachsenen. Er konnte tatsächlich bei 8 jungen Kaninchen eines Wurfes in 0,85 g Hirntrockensubstanz 0,0612 g Inosit = 7,2 % nachweisen, im Hirn des Muttertieres dagegen in 2,6 g Trockensubstanz nur 0,3 %.

Im Gehirn eines neugeborenen Kalbes fanden sich in 278 g frischer Substanz 0,5663 g Inosit, im Gehirn eines alten Stieres dagegen in 407 g Frischsubstanz nur 0,33 g.

Nach diesen Forschungsergebnissen erscheint es gar nicht verwunderlich, dass der cyclische Alkohol für bestimmte Mikroorganismen einen Wachstoffsstoff bildet, der in der Literatur die Bezeichnung "Bios 1" erhielt. Einen Schritt weiter ging WOOLLEY, der eine Hypothese aufstellte, nach der es sich beim Inosit um ein Vitamin handeln soll. Im Jahre 1906 räumte MEILLÉRE dem Inosit eine nach den heutigen Forschungsergebnissen zu hohe Stellung ein, als er erklärte: "Inosit muss unbedingt für die Entwicklung gewisser vegetativer Phasen notwendig sein. Er ist ein allgemeiner Zellbestandteil, er hat die gleiche Bedeutung wie die Glukose und ist in den Kohlenhydratstoffwechsel mit einbezogen. Dank seiner spezifischen Konfiguration ist er dazu befähigt, verschiedene Verbindungen entstehen zu lassen, was wiederum von der verschiedenen Stellung der Phosphormoleküle abhängig ist.

Im Vergleich zu den Mikroorganismen erhebt sich die Frage, welche Stellung der Inosit beim Warmblüter einnimmt. Steht er auch hier im Rang einer Substanz, die zur Erhaltung des Organismus unbedingt notwendig ist?

Trotz des ubiquitären Vorkommens ist verhältnismässig wenig über seine Funktion im Warmblüterkörper bekannt. Er scheint in den Lipoiden einen Baustein darzustellen, der nur in geringem Masse am Energiestoffwechsel teilnimmt. Es können sich jedoch auch in grossem Umfange andere Reaktionen, z.B. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen, am Inosit abspielen. Diese chemische Aktivität erklärt uns auch die Befunde, nach denen gerade in den empfindlichsten und meistbeanspruchten Organen der Inosit am reichlichsten vorkommt. Die Fermente des Verdauungstraktes spalten den im Pflanzenreich als Phytin vorkommenden Inosit nicht ab, wohl aber die Phytase, die im Leberextrakt, im Blut, und nach STARCKENSTEIN, auch im Gehirn zu finden ist. Obgleich das Hirn zu den inositreichsten Organen gehört und gegenüber dem Blutserum eine hohe Konzentration aufrechterhalten muss, ist der Einbau von C^{14} -markiertem Inosit in der beobachteten Zeitspanne (max. 40 Std.) sehr gering. Die Werte liegen dabei zwischen 0,1 - 0,3 %. Dass tatsächlich ein Einbau in die inosithaltigen Lipide der Gehirnzellen stattfindet, stellte U. FRIEDEL 1957 fest. Es war dabei nicht auszuschliessen, dass die erheblichen Inositmengen im Gehirn auch aus anderen Verbindungen synthetisiert werden können.

Da einerseits der Gehalt der Säugetierorgane unvergleichlich höher ist als an irgendeinem anderen Vertreter des Vitamin B-Komplexes, und andererseits auch der Bedarf der Versuchstiere und Mikroorganismen, die ihn nicht synthetisieren können, sehr hoch ist, scheint es berechtigt, das Cyclit nicht als Vitamin aufzufassen, sondern es in die Gruppe der essentiellen Nahrungsfaktoren, wie z.B. der exogenen

Aminosäuren und des Cholin, einzuordnen. WILLIAMS nimmt an, dass der Mensch pro Tag etwa 1 g Inosit benötigt.

Weiter erhebt sich die Frage, ob der tierische Organismus allein auf die alimentäre Inositzufuhr angewiesen ist, oder ob bei ihm eine intravitale Inositsynthese möglich ist?

Es ist nie gelungen die Vitaminnatur dieses Stoffes für den Warmblüter durch Erzeugung eines entsprechenden Mangelsyndroms zu beweisen. Diese Tatsache ergibt sich aus den Untersuchungen mehrerer Forscher. So fand NEEDHAM bereits im Jahre 1924 keine Veränderung am Gehalt freien Inosits im Gewebe von Ratten nach achtmaliger inositfreier Nahrungszufuhr. Schliesslich zeigte er noch, dass die Polyurie, die er 110 Tage aufrechterhielt, eine dauernde und gewichtige Inositausscheidung mit sich einschliesst, ohne jedoch dabei den Inositgehalt des Gewebes sichtlich zu verringern. Daraus schloss er, dass der Organismus der Ratte Inosit herstellen könne. Ein weiteres Argument für eine intravitale Inositbildung lieferten PLATT und GLOCK. Die beiden Forscher führten ihre Versuche an zwei Ratten durch. Während die eine 2 x täglich 5 g Inosit bekam, erhielt die andere inositfreie Kost. Bei diesem Versuch fanden die beiden Untersucher praktisch keinen Unterschied zwischen den Tieren, also keinerlei Ausfallerscheinungen, wie Dermatitis und Wachstumsstörungen, wie sie früher bei Inositmangel beschrieben wurden. Daraus ergab sich, dass Ratten befähigt sind, Inosit zu synthetisieren. 1942 konnte auch D. W. WOOLLEY zeigen, dass künstlich ernährte Ratten stets in der Lage sind, Inosit herzustellen. Zu analogen Schlüssen kamen 1954 H. MACK, Mc CORMICK und HARRIS durch eine ähnliche Versuchsanordnung. Sie zogen 35 - 45 g schwere Ratten 16 Wochen lang mit einer synthetischen Diät, mit und ohne Inositzusatz, oder einer Caseindiät auf. Ein Unterschied hinsichtlich der Inositausscheidung beider Tiere wurde nicht beobachtet, und morphologische Veränderungen der Gewebe bei Inositmangel waren nicht zu verzeichnen. Die synthetische Diät erzielte mit und ohne Inosit ein normales Wachstum der Ratten.

Einen grossen Fortschritt in der Frage der intravitale Inositsynthese bedeuten die Forschungsergebnisse von C. F. CHARALAMPOUS bei verschiedenen Heferassen. Er konnte nämlich zeigen, dass der m-Inosit aus kleinen Bruchstücken des Glukosemoleküls aufgebaut wird. Über entsprechende Reaktionen im Stoffwechsel des Warmblüters berichteten I. W. HALLIDAY und L. ANDERSON, sowie I. DAUGHADAY, LARNER und C. HARTNETT, als es ihnen gelang, die Umwandlung von Glukose in m-Inosit im intermediären Stoffwechsel der Ratte mit Hilfe von C^{14} -markierter Glukose zu beweisen. Dass der umgekehrte Weg möglich ist, zeigten bereits H. R. STETTEN, D. STETTEN jr., Th. POSTERNAK, H. W. SCHOPPER und D. REYMOND durch Versuche mit deuteriummarkiertem m-Inosit.

Fasst man die am Warmblüter erzielten Ergebnisse zusammen, so ergibt sich für den Kliniker unter anderem die Frage:

Unter welchen Bedingungen kommt es zu einer Inositurie? Kann ihre Genese

- a) nur eine alimentäre sein? Oder ist
- b) auch eine "endogene" Inositurie durch vermehrte Umwandlung von Glukose zu Inosit möglich?
- c) Wie verhält sich die Genese bei Nierenparenchymschädigungen, kommt es hierbei zu einer renalen Inositausschüttung?
- d) Wie entsteht die Inositurie bei Nierenkrankheiten? Handelt es sich hierbei um eine vermehrte Inositbildung der Nieren oder um eine Herabsetzung der Nierenschwelle für Inosit?

B. METHODIK

Um die Inositurie näher zu untersuchen, wurde schon früh eine Vielzahl von Nachweismethoden entwickelt. Zahlreiche chemische Verfahren, mit denen ältere Arbeiten durchgeführt wurden, haben durchwegs den grossen Nachteil, dass sie nicht streng spezifisch sind. Grösstmögliche Spezifität weisen verschiedene mikrobiologische, enzymatische und papierchromatographische Methoden auf. Wir haben uns RICHARZ und BÖHM, sowie BAUMGARTEN folgend einer Kombination von Papierchromatographie und oxydometrischer Inositbestimmung bedient. Die Trennung und Identifizierung des Inosits, wie überhaupt aller Substanzen, erfolgt hier auf Grund seines R_f -Wertes (R_f = retentions factor). Dieser Wert ist unter gleichen Bedingungen, d. h. gleicher Entwickler, gleiches Papier und gleiche Temperatur, immer derselbe.

Arbeitsgang bei der aufsteigenden Papierchromatographie

Der Arbeitsgang bei der aufsteigenden Papierchromatographie verläuft folgendermassen:

- 1) Das Papier⁺⁾ wird in 6 Spalten eingeteilt (die 2., 4. und 5. Spalte sind für den Urin bestimmt, die 1., 3. und 6. Spalte bleiben frei), ferner wird 5 cm vom unteren Rand entfernt ein horizontaler Strich gezogen (siehe Abb. 2a).
- 2) Nach Durchschütten des Urins durch ein Kohlefilter werden in Höhe der waagrechteten Linie (= Startlinie) 3 x je 40 mm³ desselben aufgetragen.
- 3) Der Harn wird während des Auftragens unter einem Föhn getrocknet, um ein Breitlaufen zu verhindern.
- 4) Daraufhin schneidet man das Papier zu und klammert es so zu einem Papierzylinder zusammen, dass es sich nur an den Anheftungsstellen berührt (siehe Abb. 2b). Auf diese Weise wird eine Ablenkung der laufenden Substanzen durch kapilläre Kräfte vermieden.
- 5) Nun stellt man diesen Zylinder über Nacht in eine das zur Chromatographie dienende Lösungsmittelgemisch enthaltende Petrischale unter eine dichtabschliessende Glasglocke (siehe Abb. 2c).
- 6) Hat das Lösungsmittelgemisch⁺⁺⁾ den oberen Rand des Papiers nach ca. 12 Std. nahezu erreicht, so muss das Papier im Abzug bei Zimmertemperatur so lange trocknen, bis es geruchlos geworden ist. Nun wird
- 7) Papierstreifen Nr. 5 abgeschnitten und mit einer Mischung von

1 Teil	5n NH_4OH
1 Teil	1/10n AgNO_3
2 Teilen	2n NaOH

besprüht und

⁺⁾ Es wurde das Papierchromatographiepapier Nr. 2043 g Mgl der Firma Schleicher & Schüll, Dassel, verwendet.

⁺⁺⁾ Zusammensetzung des Entwicklers:

- | | | | |
|----|-------|------------------|--|
| a) | 10 cm | Wasser | diese Mischung erwies sich am besten für die |
| | 10 " | Eisessig | Inositbeförderung |
| | 30 " | Isopropylalkohol | |
| b) | 50 " | (40) Essigester | hauptsächlich bestimmt für die Trennung der |
| | 30 " | (11) Pyridin | Substanzen. In Klammern stehen die Mengen |
| | 20 " | (6) Wasser | wie sie FISCHER und DÖRFEL angeben. |
| c) | 10 " | Eisessig | |
| | 10 " | Wasser | sehr geeignet zur Trennung der Aminosäuren. |
| | 40 " | Butanol | |

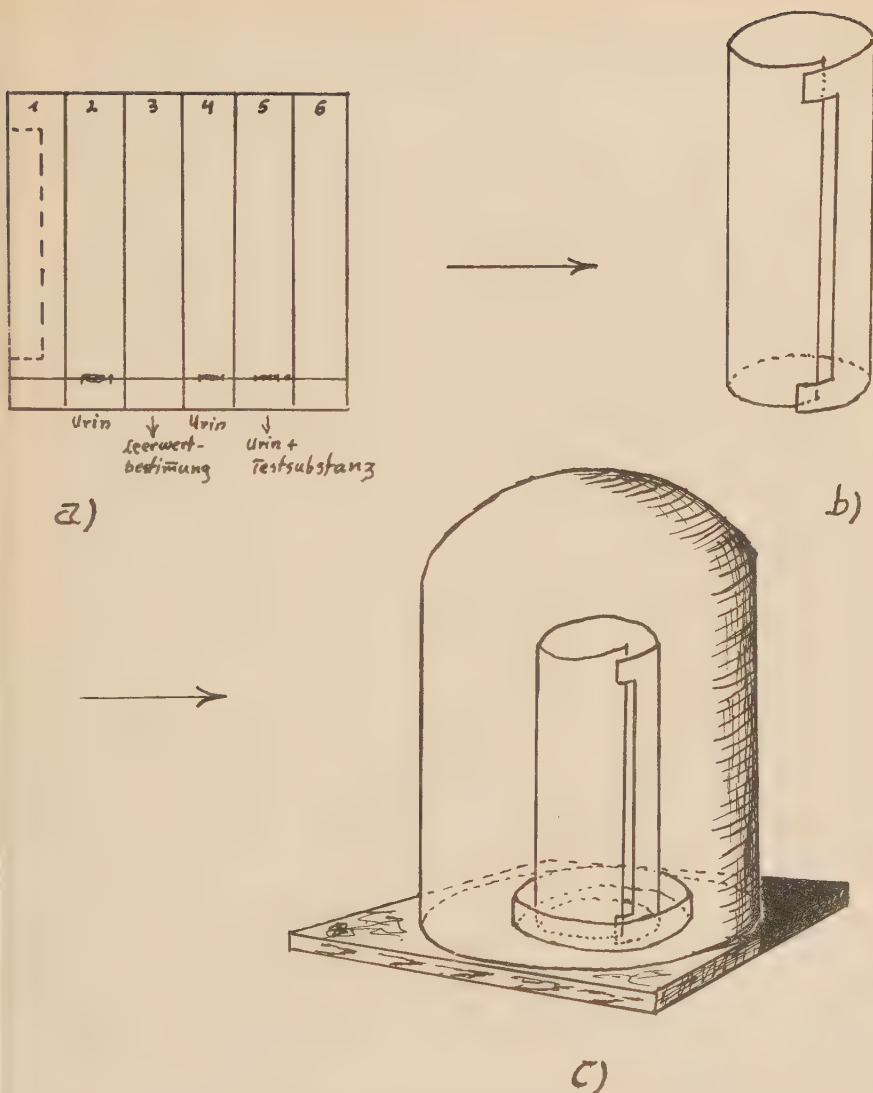


Abbildung 2: Aufsteigende Papierchromatographie

- a) Skizze zur Einteilung des Chromatographiepapiers
- b) Skizze des Papierzylinders
- c) Skizze der Chromatographievorrichtung
(Näheres siehe Text)

- 8) der jetzt wieder feuchte Papierstreifen ca. 10 sec. in ein heisses, möglichst trockenes Dampfbad gehalten bis die gewanderten Zucker in Form bräunlicher Flecke deutlich sichtbar sind. Mitunter findet man nach dem Färben, dass sich das Papier selbst auch schwarz gefärbt hat. Dieser Fehler ist durch zu intensives Besprühen und überlanges Entwickeln entstanden. Im zu starken Besprühen und auch einem bisweilen zwar heissen, aber doch recht feuchten Dampf liegt noch eine Fehlerquelle.

Dies ist der Fall, wenn die Flecken auf dem Chromatogramm nach dem Erhitzen im Dampftopf streifenförmige Ausläufer und Verziehungen nach unten aufweisen, was das Chromatogramm unbrauchbar macht. Vor dem Besprühen (mittels Pressluft und Glaszerstäuber) ist besonders darauf zu achten, dass die Trocknung der Papierchromatogramme nicht aus Zeitmangel oder Ungeduld in Hitze geschieht, denn wie schon F. BAUMGARTEN in der "Deutschen Zeitschrift für Nervenheilkunde" mitteilte, reagiert dann der Inosit auf dem Papier nicht mehr mit ammoniakalischer Silbernitratlösung, trotz Anwesenheit von Natriumhydroxyd.

- 9) Zum Fixieren ist der Papierstreifen anschliessend 5 - 15 Minuten in eine 15 %ige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zu tauchen und
- 10) ca. 1 Stunde lang zu wässern. Darauf folgt das Aufhängen und Trocknen für 5 - 6 Stunden.
- 11) Durch Bleistiftstriche wird etwa 2 cm ober- und unterhalb des sichtbar gewordenen Inositleckes die Lage des Inosits auf dem Papier markiert. Diesen Grenzen entsprechend werden nun diese beiden Linien horizontal über das unentwickelte Chromatogramm gezogen. Auf diese Weise hat man 3 kleine Papierrechtecke vor sich. Die beiden äusseren enthalten den Inosit, das mittlere dient zur Leerbestimmung.

Bei zu hoch konzentrierten Urinen ergab sich mehrmals die Notwendigkeit

der Entsalzung

(modifiziert nach CONSDEN, GORDON und MARTIN), da die mit dem Urin aufgetragenen Zucker an ihrer Wanderung durch Salze behindert waren. Man findet hierbei nach dem Besprühen auf dem Chromatogramm einen hellen Salzleck, unter dem sich dunkelbraun bis schwärzlich gefärbte Zuckerflecke stauen. Im Laufe der Versuchsreihen hat es sich als notwendig erwiesen, jedesmal am Rande des zu entwickelnden Papierstreifens einen Tropfen reinen Inosits mitlaufen zu lassen, da man bei der Differenzierung nicht selten auf die Frage stiess, ob ein nach unten auslaufender Zipfel des Inositleckes nicht noch zur nachfolgenden Glukuronsäure oder ein dementsprechend nach oben ziehender etwa schon zur Maltose gehört. Diese Entscheidung zu fällen ist an Hand des Testleckes wesentlich leichter,

da dieser das Wanderungsergebnis ohne Überlagerung eindeutig zeigt. Allerdings bleibt auch zu berücksichtigen, dass der Test-Inosit in Wasser, also einem anderen Milieu als der Harn-Inosit, gelöst war und sich papierchromatographisch etwas anders verhält.

Um den Urin zu entsalzen, pipettiert man 5 cm³ davon in das Gefäss G (siehe Abbildung 3, S. 16) auf den Quecksilberspiegel. Nun taucht man die Röhre 1 mit der semipermeablen Membran in den Harn. Durch Öffnen des Wasserhahnes wird das Quecksilber in Umlauf gesetzt. Es wird durch die Sogwirkung des Wassers tropfenweise aus der Leitung A in die Röhre 2 mitgenommen und von hier aus, nach dem Gesetz der kommunizierenden Röhren, durch Leitung B wieder in das Glasgefäss G gedrückt. Der dauernde Wechsel des Quecksilbers ist nötig, um die sich stets mit Kationen beladene Quecksilberoberfläche zu erneuern. Als Nächstes stellt man mit einem Gummischlauch (a) die Verbindung von dem Schwefelsäure enthaltenden Gefäss mit Röhre 1 her. Der Abfluss der Schwefelsäure geschieht durch Gummischlauch b. Auch hier ist ein ständiger Durchfluss aus den eben erwähnten Gründen notwendig. - Jetzt erst kann man die Apparatur an einer Stromquelle anschliessen. Der Metallstift an der Unterseite des Gefässes G wird zur Kathode, derjenige von Röhre 1 zur Anode. Um nach Schliessung des Stromkreises eine durch die Ionenwanderung hervorgerufene evtl. zu heftige Reaktion abzumildern, steht das Gefäss G in einer Kältemischung. Sollte trotzdem ein Übersäumen des Urins aus dem Gefäss G eintreten, so kann das durch Zugabe eines Tropfens Octylalkohol verhindert werden.

Die Entsalzung geschieht dadurch, dass die im Urin enthaltenen Salze in ihre Ionen zerfallen. Die Positiv geladenen Bestandteile scheiden sich an der Kathode, die negativ geladenen an der Anode ab. Die hierbei verwendete Stromspannung ist je nach Urinart individuell verschieden. Sie betrug in einem der Fälle beispielsweise 6,5 Volt bei einer Stromstärke von 0,75 Ampère. Unserer Erfahrung nach, reicht eine Stromschlussdauer von ca. einer halben Stunde, um eine für die Chromatographie genügende Entsalzung des Urins zu erreichen. Im Laufe des Vorganges steigt die Spannung, während die Stromstärke sinkt. Diese Tatsache ist leicht durch die dauernde Abnahme des Widerstandes (= Ausfällung der Salze) zu erklären.

Die Elution.

Die markierten Papierblättchen werden nun in weithalsige Erlenmeyerkolben von 20 ml Inhalt gebracht. Hierbei soll das Papier frei am Boden des Gefässes beweglich sein. Man lässt in jeden Kolben 5 cm³ Aqua bidestillata auf die darin befindlichen Papierblättchen laufen, schwenkt intensiv um, während man ruhig bis 3 zählt, schwenkt nochmals um und giesst das Wasser, das bereits den grössten Teil des leicht löslichen Inosits enthält, in bereitgestellte Jodzählkölbchen. Zur Spülung wird dieser Vorgang 4 mal mit je 2 cm³ Aqua bidest. wiederholt.

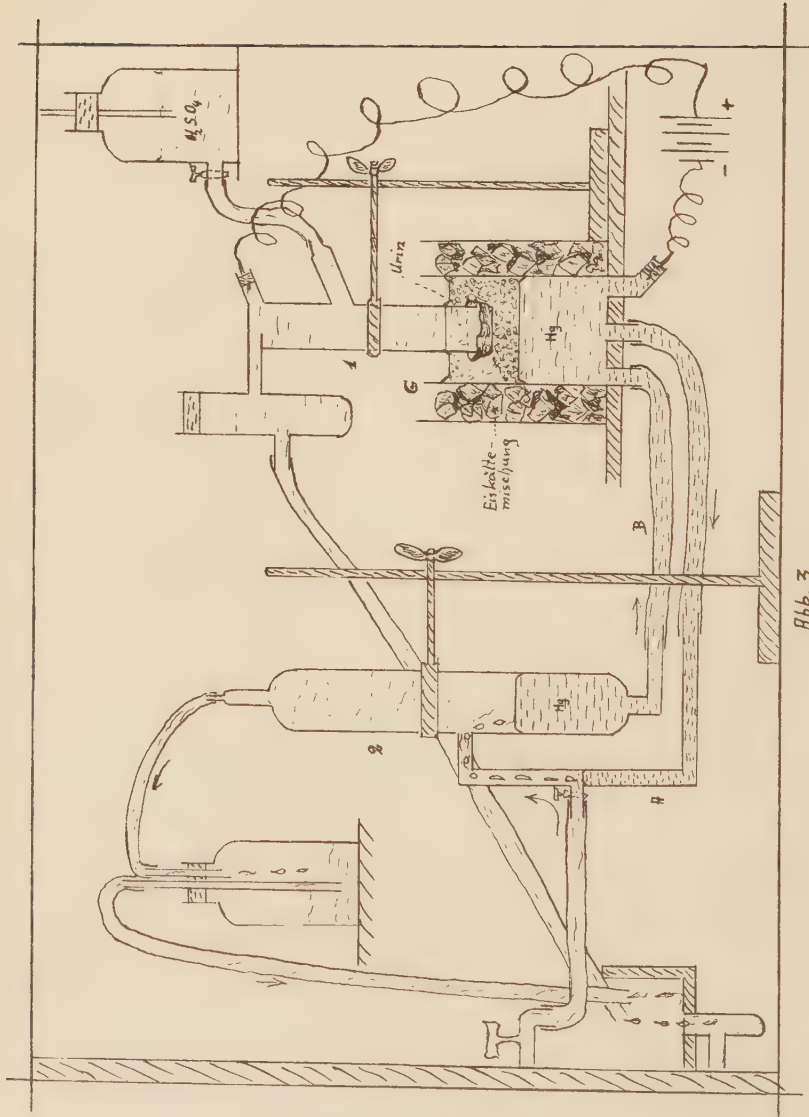


Abb. 3

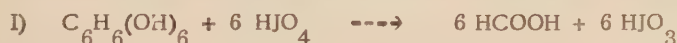
Elektrolytische Entsalzung
 modifiziert nach Consden, Gordon und Martin
 (Näheres siehe Text)

Die Oxydation und Titration.

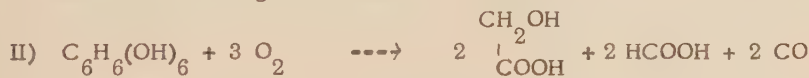
Bei Vorhandensein von weniger als 400 γ Inosit pipettiert man 2 cm³ 0,01 molarer Perjodsäure zu der Elutionsflüssigkeit (für 400 γ - 600 γ sind 3 cm³ des Oxydationsmittels nötig). Jedes Kölbchen wird gut verschlossen und in den auf genau 50° C eingestellten Trockenschrank oder Höpplerthermostaten gestellt. Bei Reihenversuchen ist es zweckmässig, die Beschickung der einzelnen Kölbchen in kurzen Zeitabschnitten von 2 - 5 Minuten durchzuführen. Man ist dadurch imstande, nach der Oxydation die Titration ohne unnötigen Zeitverlust hintereinander durchzuführen.

Nach 2 1/2 Stunden nimmt man die Kölbchen der Reihe nach aus dem Trockenschrank, fügt sofort 2 cm³ Phosphatpuffer⁺⁾ hinzu, schwenkt kurz um, versetzt das Ganze mit 2 cm³ Kaliumjodidlösung und titriert unverzüglich das in Freiheit gesetzte Jod mit Natriumthiosulfat aus einer 5 cm³ -Bürette unter Zusatz einiger Tropfen Stärkelösung⁺⁺⁾ als Indikator. Da der Titer der Natriumthiosulfatlösung stetig abnimmt, muss er für die Titration jedesmal neu bestimmt werden.

Der Titrationvorgang verläuft wahrscheinlich folgendermassen:



Vermutlich aber erfolgt die Reaktion stufenweise:



Die Reaktionszeit würde bei 8° C Oxydationstemperatur 30 Stunden betragen. Der Vorgang wird bei Anwendung einer Temperatur von 60° C auf 2 1/2 Stunden verkürzt. Die Unterbrechung ist so gewählt, dass der Perjodsäureverbrauch der Gleichung I entspricht. Durch den Pufferzusatz, der überhaupt eine Titration von Perjodsäure bei Anwesenheit von Jodsäure erst möglich macht, wird die Reaktion nicht gestoppt. Bei der Oxydation bei 50° C wird die Reaktion durch den Puffer nach 2 1/2 Stunden noch soweit verlangsamt, dass bei Verzögerung der Titration

+) Die Zusammensetzung des Phosphatpuffers:

12 g Na₂HPO₄
20 cm³ 2 N H₂SO₄
ad 100 cm³ Wasser

++) Die Stärkelösung besteht aus:

1 g löslicher Stärke und
100 cm³ gesättigter NaCl-Lösung

um wenige Minuten kein wesentlicher Fehler entsteht. Bei Verwendung von 1 molarer Perjodsäure wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch Verdünnung des Ansatzes nicht merklich beeinflusst. Anders bei Verwendung von 0,01 molarer Perjodsäure: je grösser die Verdünnung, je langsamer die Oxydation. Um eine Fehlerquelle hierbei auszuschliessen, sollen (15 cm³) 13 cm³ Elutionsflüssigkeit und 2 cm³ Perjodsäure nicht überschritten werden. Mit einem Anwachsen des Perjodsäureüberschusses, nimmt auch die für die Titration erforderliche Menge an Natriumthiosulfatlösung zu. Sehr exaktes Titrieren ist unbedingt erforderlich, da bereits 1 Tropfen der Thiosulfatlösung (= ca. 0,03 cm³) 4·10⁻⁴ Inosit entspricht.

Die Berechnung.

Wenn L der Verbrauch an cm³ Natriumthiosulfatlösung für den Leerlauf (= Leerwert), A der Verbrauch an cm³ Natriumthiosulfat für den Analysenansatz und I das Äquivalent an cm³ Natriumthiosulfat für 1 mg Inosit (= 13,33 cm³ für die 0,005 n Lösung) ist, so ergibt sich der Inositgehalt des Ansatzes in mg aus der Beziehung:

$$\frac{(L - A) \cdot f}{I} \quad (\text{dabei ist } f \text{ der Faktor der } 0,005 \text{ n Lösung.})$$

0,005 x f = Normalwert)

Beispiel:

Bei einer Patientin mit Diabetes mellitus wurden 300 cm³ Abendurin gesammelt und hieraus der Inositgehalt bestimmt.

Bei der Titration erhalten wir folgende Werte:

Jodkölbchen I	Jodkölbchen II	Jodkölbchen III
3,02	3,01	(= Leerwert)
		3,43

daraus ergibt sich:

$$A_1 = 3,02, \quad A_2 = 3,01 \quad \text{und für } L = 3,43$$

Die Faktorbestimmung^{*)} (es werden ebenfalls 2 Bestimmungen durchgeführt):

$$\text{Wert I} = 4,04, \quad \text{Wert II} = 4,08,$$

aus diesen beiden Werten erhalten wir 4,06 als Mittelwert. Also

$$f = \frac{4,06}{4}, \quad f = 1,015 \quad \text{f} = \frac{X \text{ (verbrauchtes Thiosulfat)}}{4 \text{ (cm}^3 \text{ Kaliumjodat)}}$$

*) Für die Titration zur Faktorbestimmung sind nötig:

4 cm ³ KJO ₃	nebenstehende Lösung ist mit Natriumthiosulfat bis
2 " Essigsäure	zur Farblosigkeit zu titrieren.
2 " KJ	
1 " Stärkelösung	

Hieraus ergibt sich für den Wert A_1 :

$$\text{Inositgehalt in mg} = \frac{(3,43 - 3,02) \cdot 1,015}{13,33}$$

$$= 0,0316 \text{ mg} = 31,6 \mu^* \text{ in den aufgetragenen } 40 \text{ mm}^3 \text{ Harn.}$$

In den 300 cm^3 Abendurin sind demnach 237 mg Inosit enthalten.

Eine bessere Trennung der im Harn enthaltenen Kohlenhydrate und des Inosits ermöglicht

die absteigende Papierchromatographie,

die wir aber wegen der längeren Laufstrecken und der damit verbundenen grösseren Inositverluste nicht für quantitative Bestimmungen benutzen.

Bei dieser Methode werden die Substanzen noch besser von einander getrennt, was die Forschung nach einer etwa zusätzlich oder vermehrt aufgetretenen Zuckerart sehr begünstigt bzw. überhaupt erst ermöglicht.

Wir benützten dabei die gleiche Papierart wie bei der aufsteigenden Chromatographie. Es genügt, das Papier, das im Format $80 \times 15 \text{ cm}$ geliefert wird, der Länge nach zu halbieren. Man erhält auf diese Weise 2 Streifen zu je $40 \times 15 \text{ cm}$. Einer davon wird in 3 Rubriken zu je 3 cm in gleichen Abständen, in Höhe einer Linie (= Startlinie), die 5 cm vom oberen Papierrand gezogen worden ist, eingeteilt. In den beiden äusseren Rubriken werden bereitstehende Zuckertests-substanzen und in die mittlere der zu untersuchende Urin aufgetragen. Der untere Rand des Streifens wird zur besseren Ablaufmöglichkeit des Lösungsmittelgemisches mehrfach eingezackt. Nun hängt man das Papierchromatogramm mit dem oberen Rand in ein Glasschiffchen, in dem sich bereits vor dem Einhängen des Streifens etwas von dem Lösungsmittelgemisch befinden soll, und beschwert es mit einem Glasstab. Jetzt füllt man das Lösungsmittelgemisch bis zum Rande des Schiffchens nach. Dieses ist mittels zweier Korkplättchen zwischen die Wände einer ca. 60 cm hohen Glaswanne eingeklemmt. Als Abdeckung dient eine flache Glasplatte. Zur Erhöhung der Dampfsättigung im Gefäss klebt man Filtrierpapierstreifen vom Boden aus gegen die Wände und schüttet etwas von dem Lösungsmittelgemisch in die Wanne (siehe Abbildung 4, S. 20).

Unsere Versuchsergebnisse zeigen, dass nach 40 - 45 stündiger Laufdauer eine zur Identifizierung ausreichende Trennung erreicht ist. Die weitere Behandlung geschieht in der gleichen Weise wie bei der aufsteigenden Methode.

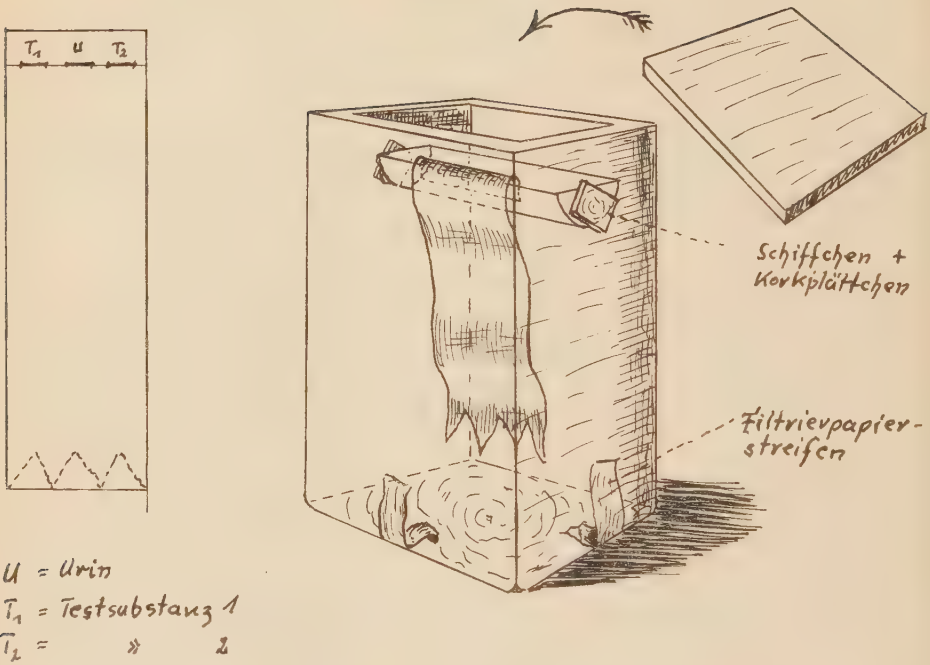


Abbildung 4: Absteigende Papierchromatographie
 (Näheres siehe Text)

C. ERGEBNISSE

I) Methodische Untersuchungen

Um die Methode im Modellversuch zu erproben, trugen wir zunächst eine uns bekannte Menge reinen Inosits auf und eluierten den aufgetragenen m-Inosit nach erfolgter Chromatographie. Da uns die ersten Ergebnisse nicht befriedigten, überprüften wir die einzelnen Schritte der Methodik, wobei wir belanglos Erscheinen des abänderten, bis wir zu befriedigenden Ergebnissen kamen. Die in biologischer Flüssigkeit erfassten Inositmengen waren häufig so gering, dass in diesem Bereich die Fehlerbreite der Methode zu gross wurde. Wir versuchten daher, wie es F. BAUMGARTEN 1958 beschrieb, durch Zusatz einer bestimmten Menge Inosit in einen optimalen Leistungsbereich des Bestimmungsverfahrens zu gelangen. Auf Grund umfangreicher Arbeiten und Ausfeilens der Bestimmungsmethode kamen wir zu dem Schluss, dass in dem Inositzusatz kein Vorzug zu erblicken ist, ja, dass sogar hierdurch oft grössere Fehler entstehen.

In 8 Bestimmungen wurden beispielsweise von 23 δ^+ aufgetragenem Inosit nachstehende Mengen wiedergefunden, und daraus der mittlere Fehler des Mittelwertes (ζ) errechnet:

Gefundene Inositmengen	d	d ²
23,25	2,25	5,06
18,75	2,75	7,56
23,25	2,25	5,06
18	3	9
16	5	25
24,8	3,8	14,44
19,5	1,5	2,25
24,5	3,5	12,25
168,05		80,62

Tabelle I

Demnach ist der Mittelwert:

$$168,05 : 8 = 21,00$$

$$\text{Summe von } d^2 = 80,62$$

Zur Erläuterung der angewandten Bezeichnungen:

n = Anzahl der Versuche

d = Differenz zwischen Mittelwert und tatsächlich gefundener Inositmenge

Σ = Summe

ζ = mittlerer Fehler des Mittelwertes

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (d^2)}{(n-1)}} = \sqrt{\frac{80,62}{7}} = \sqrt{11,52}$$

$$\sigma = 3,38 (\sigma)$$

Auftragsart

mm ³ Harn	Inositzusatz in σ^+	Fall I	Fall II	Fall III	Fall IV
20	+ 20	9 0,75	2,25 6,75	4 0,25	4,86
40	+ 0	12 5,25	6 11,25	2,75	3,75
40	+ 20	3,75	6 6,75	9,5 11,5	6,9
60	+ 0	3,75 1,5	12	12 7,12	5,25

Tabelle II

Der mittlere Fehler des Mittelwertes wurde wie vorhin berechnet und betrug für Fall I 3,12 (σ), Fall II 3,34 (σ), Fall III 4,55 (σ) und Fall IV 1,3 (σ).

Auf Grund der aus beiden Tabellen hervorgehenden Ergebnisse und der praktischen Erfahrung in der Methodik können wir Folgendes aussagen:

- 1) Für den quantitativen Inositznachweis im Harn sollen

entweder 40 mm³ Harn
 oder 40 mm³ Harn + 20 σ Inositzusatz
 oder 60 mm³ Harn

auf das Papierchromatogramm aufgetragen werden. Wir konnten nachweisen, dass sich aus kleineren oder grösseren als die angegebenen Harnmengen nur noch ungenauere Werte erzielen lassen.

- 2) Geringe Harnmengen, auch nach Inositzusatz, sind nicht verwertbar. Ebenso ergeben grössere Harnmengen, im allgemeinen durch die aufsteigende Papierchromatographie bei der üblichen Auftragbreite von 3 cm nicht genügend getrennt, unbrauchbare Resultate.

+) Die in der Tabelle (in Zeile 1 und 3) angegebenen Resultate verstehen sich nach Abzug des Inositzusatzes.

- 3) Die Fehlerbreite der Modellversuche war befriedigend. Besonders instruktiv war das Elutionsergebnis bei bekannter aufgetragener Inositmenge. Bei 8 Bestimmungen wurden von 23 μ aufgetragenem Inosit durchschnittlich $21\frac{1}{2} + 3,38\frac{1}{2}$ Inosit wiedergefunden.
- 4) Es sind in jedem Fall, um eine möglichst genaue Bestimmung durchzuführen, alle 3 Auftragsarten auf einmal zu machen und dann daraus der Mittelwert zu errechnen.

Damit erwies sich das Verfahren für die vorgesehenen Untersuchungen als hinreichend genau. Durch seine Spezifität ist es zu dem den meisten früher angewandten Methoden weit überlegen.

Die auf mikrobiologischem Verfahren beruhenden Bestimmungen übertreffen gleichfalls an Genauigkeit und Spezifität die anderen. Die Fehlerbreite dieser Methodik ist dabei nicht viel geringer als bei der von uns benützten. Mikrobiologische Bestimmungen haben zudem noch den Nachteil, dass sie einige Tage mehr in Anspruch nehmen als die Papierchromatographie. Da in der Klinik möglichst schnell, genau und wirtschaftlich gearbeitet werden muss, bedeutet letztere Methode eine Ersparnis an Zeit und Geld.

Ein an Präzision nicht mehr zu überbietender Nachweis ist der enzymatische. Dieses Verfahren ist sicherlich das genaueste und subtilste aller bekannten. Einerseits aber wird die Beschaffung der Inositdehydrogenase auf finanzielle Schwierigkeiten stossen, andererseits ist es von geringer Bedeutung, den Inosit zu diagnostischen Zwecken auf einige μ genau zu bestimmen.

Aus diesen Überlegungen heraus kamen wir zu dem Schluss, dass das von uns durchgeführte Verfahren den klinischen Bedürfnissen entspricht.

II) Klinische Untersuchungen

- 1) Zunächst untersuchten wir die verschiedensten Harne nach ihrem Inositgehalt. Zur besseren Übersicht seien die einzelnen Fälle in einer Tabelle zusammengeschrieben.

Zur Erklärung der in der Tabelle angewandten Abkürzungen:

TU = Tagesurin

AU = Abendurin

NU = Nachturin

Name	Alter	Urinart und -menge	Inositgehalt in mg%	Inositmenge pro Harnportion (mg)	Diagnose
1) K.P.	22 J	NU, 650 cm ³	34,5	224,25	Normalurin
2) K.P.	22	TU, 600 "	10	60	"
3) E.A.	25	TU, 250 "	35,65	90	"
4) G.E.	31	TU, 200 "	21,25	42,5	"
5) G.E.	31	AU, 350 "	35,5	117,25	"
6) A.E.	49	AU, 250 "	25,3	63,25	"
7) K.L.	19	AU, 200 "	17,5	35	"
8) L.A.	52	NU, 650 "	14,5	94,25	leichter Al- tersdiabetes
9) B.E.	71	TU, 850 "	51	433,5	"
10) B.E.	71	TU, 800 "	45,5	364	"
11) B.E.	71	AU, 1000 "	38	380	"
12) B.E.	71	NU, 1350 "	47,7	643,9	"
13) S.L.	70	AU, 1250 "	79	987,5	schwerer Dia- betes mellitus
14) S.A.	57	TU, 300 "	14,5	43,5	Altersdiabetes
15) S.M.	74	NU, 700 "	19	133	"
16) S.M.	74	NU, 850 "	57,15	485,8	"
17) S.S.	63	TU, 350 "	22,5	78,74	"verwilderter Diabetes"
18) K.E.	45	TU, 450 "	25	112,5	Diabetes mellitus
19) A.A.			35		"
20) A.A.			25		"
21) H.T.			105		"
22) H.T.			90		"
23) H.T.			35		"
24) H.T.			45		"
25) L.S.		TU, 350 "	81,5	285,5	"
26) L.M.			27,5		"
27) L.M.		AU, 400 "	112	448	"
28) W.M.	71	TU, 500 "	20,25	101,25	1. Tag nach einem Prae- coma diabet.
29) W.M.	71	AU, 650 "	0	0	"
30) W.A.	35	AU, 250 "	18,9	47,25	akute Glome- rulonephritis
31) P.E.			80		Pyelonephritis

Name	Alter	Urinart und -menge	Inositgehalt in mg%	Inositmenge pro Harnportion (mg%)	Diagnose
32) S. H.			60		Nephritis (Gra- viditas mens VI)
33) S. H.			32,5		"
34) S. W.	20 J	TU, 550 cm ³	6,6	36,3	Schwanger- schaftsnephri- tis
35) S. W.	20	TU, 400 "	6,1	24,4	"
36) Z. J.	36	TU, 700 "	13,4	93,8	Diabetes in- sipidus (Hypo- physentumor)
37) S. E.	27	TU, 500 "	39,9	199,5	Hypoglykämie
38) S. E.	27	AU, 650 "	20	130	"
39) R. A.	23	TU, 3500 "	0	0	Diabetes in- sipidus
40) K. E.	44	TU, 3330 "	0	0	"
41) M. Ch.			49		chron. myelo- ische Leukä- mie
42) M. Ch.			57,5		"
43) M. Ch.			12,5		"
44) L. S.		TU, 250 "	55	137,5	Perniziöse Anämie
45) K. G.		TU, 300 "	80	240	Hepatitis epidem.
46) K. G.		NU, 450 "	107	481,5	"

2) Im Laufe unserer Arbeit untersuchten wir nicht nur Einzelurine, sondern auch die 24-Stunden - Inositausscheidung.

Folgende Tabelle mag darüber Aufschluss geben:

Name	Alter	Urinart und -menge	Inositgehalt in mg%	Gesamtinosit- ausscheidung pro 24 Std.	Diagnose
47) Z.J.	36 J	TU, 2000 cm ³ AU, 500 " NU, 1500 "	9,5 42 0	190 mg 210 " 0 <u>400 mg</u> =====	Diabetes insipidus bei gesichertem Hypophysentumor
48) Z.J.	36	TU, 1500 " AU, 850 " NU, 900 "	52,15 32,85 38,35	782,25 mg 279,23 " 345,15 " <u>1406,63 mg</u> =====	"
49) Z.J.	36	TU, 800 " AU, 1600 " NU, 1200 "	29,4 12 20	235,2 mg 192 " 240 " <u>667,2 mg</u> =====	"
50) K.E.	44	24 Std. Harn 6000 cm ³	0	0	Diabetes insipidus
51) K.E.	44	24 Std. Harn 7500 cm ³	0	0	" "
52) K.E.	44	24 Std. Harn 3900 cm ³	0	0	" "
53) R.A.	23	24 Std. Harn 7150 cm ³	0	0	" "
54) S.S.	63	TU, 350 cm ³ AU, 400 " NU, 750 "	22,5 31,5 15,5	78,75 mg 126 " 116,25 " <u>321 mg</u> =====	verwilderter Diabetes mellitus
55) S.S.	63	TU, 200 " AU, 500 " NU, 900 "	25 18,15 15	50 mg 90,75 " 135 " <u>275,75 mg</u> =====	" "
56) W.M.	71	TU, 500 " AU, 650 " NU, 700 "	20,25 0 0	101,25 mg 0 0 <u>101,25 mg</u> =====	kurz nach einem Praekoma diabet.
57) K.L.	38	24 Std. Harn 750 cm ³	20	150	Diabetes mellitus

Name	Alter	Urinart und -menge	Inositgehalt in mg%	Gesamtinosit- ausscheidung pro 24 Std.	Diagnose
58) H. M.	68 J	TU, 750 cm ³ AU, 350 " NU, 500 "	16,25 5 26,25	113,75 mg 105 " 131,25 " <u>350 mg</u> =====	Diabetes mellitus
59) Z. S.	72	TU, 500 " AU, 450 " NU, 200 "	38,5 2,75 46,85	192,5 mg 12,37 " 93,7 " <u>308,57 mg</u> =====	" "
60) H. B.	68	TU, 2700 " AU, 1200 " NU, 1500 "	17 14 9,25	459 mg 168 " 138,75 " <u>766,75 mg</u> =====	" "
61) W. M.	36	TU, 500 " AU, 400 " NU, 600 "	62 34 57,2	310 mg 136 " 343,2 " <u>789,2 mg</u> =====	" "
62) L. M.	78	TU, 350 " AU, 500 " NU, 600 "	22,5 17,5 31,5	78,75 mg 87,5 " 189 " <u>355,25 mg</u> =====	" "
63) K. M.	50	24 Std. Harn 800 cm ³	17,5	140 mg	chronische Glome- rulonephritis
64)		24 Std. Harn 1050 cm ³	25,2	264,6 "	"
65)		24 Std. Harn 950 cm ³	5,6	53,2 "	"
66) G. A.	47	24 Std. Harn 1100 cm ³	23,5	258,5 "	Glomerulonephri- tis
67)		24 Std. Harn 1500 cm ³	40	600 "	
68) L. E.	56	24 Std. Harn 750 cm ³	14,35	107,62 "	Pyelonehritis
69) V. V.	54	24 Std. Harn 950 cm ³	17,5	166,25	Nephritis

Name	Alter	Urinart und -menge	Inositgehalt in mg%	Gesamtinosit- ausscheidung pro 24 Std.	Diagnose
70) M.J.	18 J	24 Std. Harn 1700 cm ³	84,2	1431 mg	jugendlicher Nephritiker
71) H.I.	45	24 Std. Harn 1600 cm ³	25	400 "	Nephrose
72) R.G.	52	24 Std. Harn 750 cm ³	21,5	151,25 "	schwere Lungen- tuberkulose
73)		24 Std. Harn 850 cm ³	25	212,5 "	"

Diskussion der Ergebnisse:

Zur besseren Vergleichsmöglichkeit seien die wichtigsten Resultate noch einmal kurz zusammengefasst:

Art der Erkrankung	Inositausscheidung in mg%
Normalurin	10 - 36
Diabetes mellitus leicht	15 - 58
Diabetes mellitus schwer	22 - 112
Diabetes insipidus	0
Diabetes insipidus (bei einem klinisch gesicherten Hypophysentumor)	0 - 52
Nephritis - Nephrose	6 - 80
Hepatitis epidemica	ca. 90

I) Normalurin

Bei der von W. DAUGHADAY, LARNER und E. HOUGHTON angegebenen täglichen Inositausscheidungs menge bei Gesunden von 8 - 144 mg liegt der Maximalwert unserer Ergebnisse (Nr. 1 - 7) um ca. 200 mg zu tief. Ein rein qualitatives Inositvorkommen im Urin gesunder Personen konnten HOPPE - SEYLER 1909, STARKENSTEIN und L. HUGOUNEQ 1954, MEILLÈRE und FLEURY bestätigen, im Gegensatz zu COCHOT, CLOETTA und GALLOIS, die keinen Inosit finden konnten.

II) Die vorstehenden Ergebnisse stimmen mit denen von JOHNSON, MITCHELL und S. HAMILTON, die täglich 15 mg fanden, nicht überein. Selbst eine von anderen Autoren angegebene Tagesausscheidung von 26 - 144 mg ist nach unseren Erfahrungen für viele Fälle noch zu niedrig bemessen. In den Berichten von MEILLÈRE und FLEURY 1909, über die Glukosurie und Inositorie liegt unserer Erfahrung nach der angegebene Maximalwert von 2 g pro die zu hoch. Die von LEVA angegebenen Werte der täglichen Inositausscheidung im Diabetikerurin von 0,0013 - 0,079 g% bei einer Tagesausscheidungsmenge von 5 - 5,8 l konnten wir bei unseren Untersuchungen nie beobachten.

Nie konnten wir etwas derartiges beobachten wie VOHL, nach dem der Inositgehalt im diabetischen Harn im umgekehrten Verhältnis zu Glukose und Harnstoff stehen soll, und zwar derart, dass z.B. im 24^h-Sammelurin 18 - 20 g (!) Inosit aber keine Glukose und kein Harnstoff mehr vorkamen. Nach einer rein spekulativen Theorie kommt es seiner Meinung nach im diabetischen Organismus zu einer Umwandlung von Glukose zu Inosit. Wie VOHL konnte u.a. GUELLIOT den Cyclit in dem Augenblick im Harn eines Diabetikers nachweisen, als sich die Glukosemengen verringerten. Diese Tatsache konnten wir grundsätzlich nicht bestätigen. MEILLÈRE und FLEURY fanden bei einem Patienten mit transitorischer Glukosurie stets eine Inositorie von 0,25 - 2 g pro Liter Harn; die Inositausscheidung folgte dabei auf die Glukoseausscheidung. Weiterhin stellten sie fest, dass in jedem Fall von transitorischem Diabetes die Inositorie die Glukosurie überschreitet und keine Begleiterscheinung der Polyurie ist. Ihre experimentellen Erfahrungen über den Zusammenhang zwischen Glukosurie und Inositorie wurden durch CAMUS und GALLOIS bestätigt. Wir können uns diesen Ausführungen nur teilweise anschließen: In zahlreichen Untersuchungen übertraf die Inositausscheidungsmenge niemals die Glukoseausscheidungsmenge. In manchen Fällen liegt sie geringgradig unter ihr und geht ihr parallel (Nr. 4, 12, 13, 16, 21, 22, 24, 25, 27, 32 und 37).

1906 veröffentlichte H. GEORGES in einer Abhandlung, dass die Inositorie ausser beim Diabetes mellitus auch bei Albuminurie und einfacher Polyurie vorkommen könne. Bei Diabetikern erhielt er völlig uneinheitliche Ergebnisse. Beim ikterischen Harn verschiedener Krankheitszustände, bei doppelseitiger Salpingitis, Cystitis und aufsteigender renaler Infektion dagegen deutlich negative.

Die oben zitierten Ergebnisse einer erhöhten Inositausscheidung beim Diabetiker wurden auch bereits mit Inositbelastung im Tierexperiment gewonnen. Im Jahre 1954 brachten W.H. DAUGHADAY, LARNER und E. HOUGHTON ihre Forschungsergebnisse über die Inositorie heraus. In dieser Veröffentlichung kamen sie zu der Feststellung, dass Diabetiker mehr Inosit im Harn ausscheiden als Gesunde. Die Wissenschaftler gelangten zu dem Resultat, indem sie bei Ratten durch subtotale Pankreatektomie bzw. Alloxangaben einen Diabetes melli-

tus erzeugten und die Inositausscheidung durch die Clearancemethode bestimmten. Neben der Inositausscheidung forschten sie auch noch nach der Inositorresorption im Darm und kamen zu dem Schluss: Diabetische Tiere scheiden mehr Inosit aus als die gesunden Versuchstiere, und zwar umso mehr, je höher die aufgenommenen Inositmengen waren. Die Inositorresorption bei diabetischen Tieren geht wesentlich schneller, was zur Folge hat, dass hier viel höhere Inositplasmakonzentrationen erreicht werden.

Weit mehr Beachtung möchten wir den Arbeiten der eben erwähnten Forschergruppe schenken, wenn auch deren Maximalwerte der Inositausscheidung nach unserer eingehenden Prüfung sowohl bei Normalen als auch bei Diabetikern um ca. 200 mg zu tief liegen dürften. Diese Wissenschaftler untersuchten nämlich bei 11 Normalen und 7 Diabetikern die renale Ausscheidung von Inosit mit der Bestimmungsmethode von ATKIN, WILLIAMS, SCHULTZ und FREY. Die normalen Versuchspersonen scheiden, wie bereits vorher erwähnt, täglich im Durchschnitt 37 mg (8 - 144 mg) Inosit aus. Eine Beeinflussung der Inositausscheidung durch die Harnausscheidungsgrösse war nicht zu beobachten. Bei den Diabetikern lagen die täglichen Inositausscheidungsmengen zwischen 280 - 851 mg. Durch eine ausreichende Insulinverabreichung konnte die Inositausscheidung deutlich verringert werden, ja sie wurde sogar zum Verschwinden gebracht. Nach peroraler Gabe von 3 g Inosit stieg die Inositausscheidung beim Normalen um 23 mg an, beim Diabetiker um 405 mg. Die Verabreichung von 20 mg Inosit pro kg Körpergewicht i.v. bewirkte bei Diabetikern eine 3 x so starke Ausscheidung wie bei den Normalen.

Diese Ergebnisse können wir im Prinzip bestätigen, da auch wir grundsätzlich die Beobachtung einer höheren Inositausscheidung bei Diabetikern machten; und zwar lag diese allgemein umso höher je schwerer der Diabetes war. Eine Ausnahme hiervon bildeten Patienten im Zustand einer Hypoglykämie (Nr. 28, 37, 38 und 56). Trotz fast völligen Fehlens einer Glukoseausscheidung im Harn fanden wir in 3 Fällen (Nr. 37, 38 und 28) normal grosse Inositmengen im Harn.

Von grosser klinischer Bedeutung ist, dass das vermehrte Inositvorkommen bakterielle Erkrankungen der ableitenden Harnwege sowie Allgemeininfekte begünstigen dürfte. Diese Tatsache liesse sich erklären, wenn man bedenkt, dass einerseits Inosit ein Bakterienwuchsstoff ist, und andererseits gerade Menschen mit hohem Inositgehalt im Blut und Urin, z.B. wie die Diabetiker, besonders infektanfällig sind.

- III) Bei der Inositsuche bei Patienten mit Diabetes insipidus kamen die Forscher zu völlig von einander abweichenden Ergebnissen. K. VOIT und H. SECKFORT konnten 1953 bei ihren Untersuchungen über den unbekannten Kohlenstoff des Harnes in zwei Fällen von Diabetes insipidus insbesondere eine Ver-

mehrung des mit dem Urin ausgeschiedenen Kohlenstoffs nicht feststellen. Der Quotient C : N erwies sich als normal, es konnte also der Urin unmöglich grössere Mengen Inosit enthalten.

E. KÜLZ konnte in zwei Fällen von Diabetes insipidus, die innerhalb von 24 Stunden 4 - 5 Liter ausschieden, Inosit nachweisen. In einem anderen Fall fand er bei einer Ausscheidung von 20 l innerhalb 24 Stunden keinen.

Auch unsere Ergebnisse sind sehr widerspruchsvoll. In einem Fall mit einem klinisch sicher nachgewiesenen Hypophysentumor mit Diabetes insipidus, lagen die Inositausscheidungswerte sehr hoch (Nr. 37, 47, 48 und 49). Bei zwei weiteren Patientinnen ohne nachweisbarem Tumor der Hypophyse aber mit Diabetes insipidus (Nr. 39 und 40) waren niemals Inositspuren im Harn zu finden.

Auf Grund dieser Untersuchungen können wir die Feststellung von MEILLÈRE und FLEURY bestätigen, dass die Inositurie keine Begleiterscheinung der Polyurie ist, sondern in engem Zusammenhang mit der Glukosurie steht.

- IV) Die Inositausscheidungsmengen im Harn bei verschiedenen Nierenerkrankungen waren bei unseren Untersuchungen recht unterschiedlich. Meist lagen sie im Bereich der Normalwerte zwischen 6,1 - 32,5 mg% (Nr. 30, 33, 34, 35, 63, 64, 65, 66, 68, 69 und 71). In zwei Fällen von chronischer Glomerulonephritis kamen wir auf Werte von 40 bzw. 60 mg% (Nr. 32 und 67). 80 mg% fanden wir bei einer Patientin mit Pyelonephritis (Nr. 31). Die höchste Inositmenge (84,2 mg%) im Harn konnten wir bei einem Jugendlichen mit chronischer Nephritis nachweisen (Nr. 70).
- V) Auffallend viel Inosit (80 bzw. 107 mg%) enthielt der Urin einer Patientin mit Hepatitis epidemica (Nr. 45 und 46). Es bleibt hierbei noch zu klären, ob dieses Verhalten der Laevulosurie oder Glukosurie analog ist, d.h. ob die Leber infolge Parenchymschädigung alimentär angeborenen Inosit nicht in Glukose umwandeln kann.
- VI) Die Ursache für die erhöhte Inositurie (bis 57,5 mg%) bei chronischer myeloischer Leukämie (Nr. 41, 42 und 43) ist unbekannt.

Nachdem die Angaben in der Literatur über die per orale Inositbelastung recht unterschiedlich sind bzw. überhaupt fehlen, führten wir selbst Belastungen zuerst an einem Gesunden, dann bei 2 Patientinnen mit Diabetes mellitus, bei 2 Patientinnen mit Diabetes insipidus und bei einem jungen Mann mit chronischer Glomerulonephritis durch.

Bei allen Versuchen wurden jedesmal 15 g Inosit in Wasser gelöst und dann p. o. eingenommen. Eine Ausnahme davon bildete lediglich der erste Versuch, bei dem der Proband 30 g Inosit ohne Flüssigkeit zu sich nahm. Die Inositausscheidung im Harn wurde bei jedem Versuch durchschnittlich 48 Stunden lang kontrolliert. Die am Schluss dieser Arbeit beigefügten graphischen Darstellungen sollen die Ausscheidungsverhältnisse bei den jeweiligen Versuchen verdeutlichen.

Die erste Belastung führten wir an einem gesunden Probanden durch. Nach p. o. Einnahme von 30 g Inosit schied er in den ersten 24 Stunden in 850 cm^3 Urin ³ 3129 mg Inosit wieder aus. In den folgenden 17 Stunden konnten wir in 350 cm^3 Urin 217,8 mg Inosit nachweisen. Diese Ausscheidungswerte entsprechen aber nicht ganz einem normalen Verlauf, da der Inosit einen leichten Durchfall erzeugte, wodurch wahrscheinlich ein Teil der aufgenommenen Inositmenge durch den Darm nicht zur Resorption gelangen konnte. Aus diesem Grunde wurden in den folgenden Versuchen nur mehr 15 g Inosit verabreicht.

Bei der Wiederholung dieses Versuches (Abb. 6), diesmal mit 15 g Inosit, wurden in den ersten 24 Stunden in 800 cm^3 Harn 423,8 mg des Cyclits ausgeschieden. In weiteren 24 Stunden waren es in 970 cm^3 Urin noch 201,5 mg. Insgesamt wurden also im 48-Stundenurin $624,34 = 0,6 \text{ g}$ Inosit abgegeben, das sind 4 % der aufgenommenen Menge.

Bei der ersten Patientin mit Diabetes mellitus (Abb. 7 und 8) wurden in den ersten 24 Stunden in 2450 cm^3 Harn 976 mg Inosit wiedergefunden. In den zweiten 24 Stunden waren es in 2600 cm^3 Urin 877,3 mg. Das ergibt eine Gesamtausscheidung von $1853,3 \text{ mg} = 1,8 \text{ g}$ Inosit in 48 Stunden. Es wurden also von der aufgenommenen Inositmenge 12 % im Harn wieder abgegeben.

Im zweiten Fall von Diabetes mellitus (Abb. 9 und 10) wurden in den ersten 24 Stunden in 2800 cm^3 Harn 1264 mg Inosit ausgeschieden, in den zweiten 24 Stunden in 2450 cm^3 503 mg. Die Gesamtausscheidung betrug demnach 1767 mg, also wiederum ca. 12 %.

Anders lagen die Verhältnisse bei der Inositbelastung einer Patientin mit Diabetes insipidus. Zunächst wurden wie immer $0,04 \text{ cm}^3$ Harn auf das Chromatographiepapier aufgetragen und nachdem sich auf dem Papierchromatogramm kein Inosit, ja nicht einmal Glukose darstellen liess, trugen wir jedesmal $0,1 \text{ cm}^3$ Harn auf. Selbst bei dieser Menge konnten 13 1/2, 24 und 27 Stunden nach der Inositapplikation quantitativ nicht mehr zu erfassende Spuren Inosit chromatographisch zur Darstellung gebracht werden. Die Patientin hatte in 24 Stunden eine Urinausscheidungs-
menge von 7200 cm^3 .

In einem zweiten Fall von Diabetes insipidus (Abb. 11) erhielten wir wenigstens in den ersten 9 Stunden nach der Inositaufnahme ein deutlich positives Ergebnis.

Wir konnten nämlich während dieser Zeit aus 3400 cm³ Urin 408, 75 mg Inosit eluieren. Nachher war nicht einmal mit der absteigenden Papierchromatographie ein Inositsnachweis zu erbringen.

Die Untersuchung des Urins bei einem jugendlichen Nephritiker nach der Belastung mit 15 g Inosit ergab in den ersten 24 Stunden eine Inositausscheidung von 515, 5 mg. In den folgenden 8 Stunden wurden noch 136 mg mit dem Urin abgegeben (Abb. 12). In 32 Stunden wurden also 750 mg Inosit, das sind ca. 5 % der eingenommenen Menge, wieder ausgeschieden.

Diskussion:

Aus unseren Belastungsversuchen ist ersichtlich, dass der gesunde Mensch etwa 4 % der aufgenommenen Inositmenge in 48 Stunden wieder ausscheidet. Damit liegen wir etwa in der Mitte der in der Literatur angegebenen Ausscheidungs-mengen.

Bei Patienten mit Diabetes mellitus beläuft sich die Inositausscheidung im Harn auf ca. 12 % der aufgenommenen Menge. Dieses Ergebnis lässt sich nur schwer mit den Ergebnissen anderer Autoren vergleichen, da in der Literatur ausser 3 Untersuchungen von KÜLZ aus dem Jahre 1876 keine weiteren bekannt geworden sind. Die Werte von KÜLZ liegen zwischen 0,5 und 1,2 % der applizierten Menge. Allerdings muss man hier in Betracht ziehen, dass diesem Forscher vor rund 80 Jahren noch keine feineren Untersuchungsmethoden wie heute zur Verfügung standen.

Jegliche Vergleichsmöglichkeit fehlt uns bei den Belastungsversuchen bei Patienten mit Diabetes insipidus und bei Nephritis. Bei Diabetes insipidus dauert, falls überhaupt eine Inositabgabe im Harn erfolgt, diese nur kurze Zeit an und überschreitet 2,6 % der zugeführten Menge nicht. Sie liegt damit deutlich unter der Norm.

In einem Fall von Nephritis wurden 5 % des applizierten Inosits ausgeschieden. Dieser Wert liegt also noch im normalen Bereich. Ob in gewissen Fällen von Nephritis eine vermehrte Inositausscheidung nach Belastung vorliegt, müssten weitere Untersuchungen klären.

Hinsichtlich der Inositesorptionsgeschwindigkeit und -ausscheidung lässt sich sagen:

Bei Gesunden erreichten wir frühestens 5 bzw. 9 Stunden nach der Inositapplikation die maximale Ausscheidungs-menge, nach 20 Stunden ist die individuelle physiologische Inositskonzentration im Harn, abgesehen von unbedeutenden Nachschwankungen, wieder erreicht.

Im Falle eines Diabetes mellitus ist das Maximum der Ausscheidung nach sehr steilem Anstieg bereits nach 2, spätestens nach 4 Stunden erreicht. Im Vergleich zum Gesunden fällt die Inositausscheidungskurve langsamer ab und unterliegt bis zur Erreichung der Ausgangswerte stärkeren Schwankungen.

Bei Patienten mit Diabetes insipidus finden wir, wenn sich nach der Belastung überhaupt Inosit nachweisen lässt, nach 2 1/2 Stunden das Maximum der Inositabgabe, während nach 10 Stunden der Ausgangswert wieder erreicht ist.

Ähnliche Daten wie bei Gesunden fanden wir bei einem Nephritiker. Hierbei lag die Ausgangskonzentration höher.

Die Ursache für die vermehrte Inositurie bei Diabetes mellitus dürfte darin zu suchen sein, dass Glukose und Inosit in der Niere bei der Rückresorption konkurrieren. Beim Diabetes mellitus wird der Vorgang, an dessen Zustandekommen Phosphorylierungen beteiligt sind, durch die vermehrt vorhandene Glukose voll in Anspruch genommen, sodass ein grosser Teil des im Glomerulusfiltrat enthaltenen Inosits ausgeschieden wird.

Die in manchen Fällen von Glomerulonephritis beobachtete vermehrte Inositurie dürfte gleichfalls auf einer Störung der tubulären Rückresorption beruhen.

Alle Versuche zeigen, dass der Inosit im Organismus in engen Grenzen konstant gehalten wird. Die Niere ist offenbar imstande kleinere Inositmengen, die den physiologischen Gehalt des Serums nicht wesentlich erhöhen, tubulär zu resorbieren. Bei stärkerer Belastung werden immer grössere Mengen Inosit ausgeschieden. Die Inositurie bei Diabetes mellitus ist demnach als Folge der Glukosurie und nicht der Polyurie anzusehen.

D. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Es wurde eine quantitative papierchromatographische Methode zur Inositbestimmung im Harn entwickelt, kritisch in verschiedenen Variationen durchgeprüft und zur Untersuchung verschiedener klinischer Fragen benutzt.
- 2) Im Harn von Gesunden fanden wir 10 bis 36 mg% Inosit, im 24 Stunden-Harn 180 bis 350 mg. Bei Diabetes mellitus kommen mit Werten bis 112 mg% bzw. 790 mg deutlich übernormale Inositwerte vor, meist bei schwerem oder schlecht eingestelltem Diabetes. Bei anderen Fällen findet man auch normale Werte.
- 3) Auch bei Glomerulonephritis und Hepatitis epidemica kommt eine pathologisch vermehrte Inositurie vor.
- 4) Die von anderen Autoren angegebene vermehrte Inositausscheidung bei Diabetes insipidus konnten wir im allgemeinen nicht bestätigen. Bei dieser Krankheit pflegt im Gegenteil die Inositurie abnorm gering zu sein.
- 5) Inositbelastungen zeigten beim Gesunden eine Ausscheidung von ca. 5 % der gegebenen 15 g Inosit innerhalb 48 Std.
Bei Diabetes mellitus waren es 12 % der applizierten Menge in 48 Std.
Bei Diabetes insipidus waren es maximal 2,7 % in 9 Std., nach dieser Zeit war kein Inosit mehr nachzuweisen.
Bei einem Fall von Glomerulonephritis lag der Wert im Bereich der Norm.
- 6) Das Zustandekommen des pathologischen Phänomens und die Bedeutung der Inositurie wurde diskutiert.

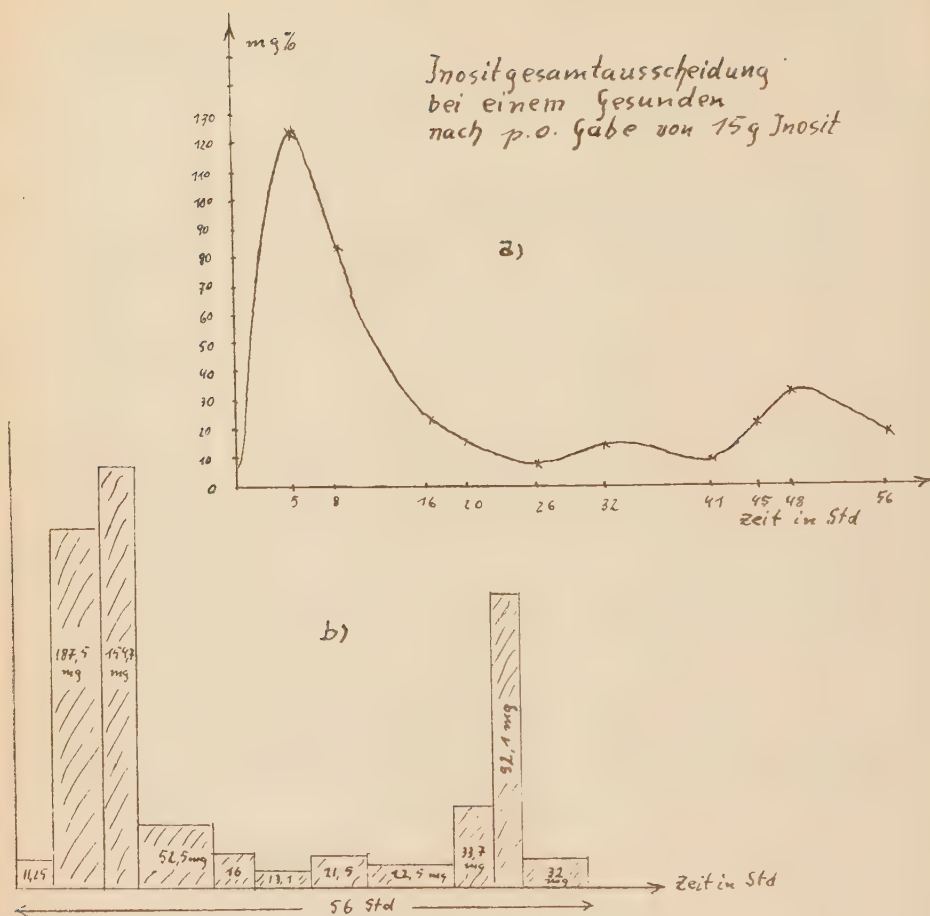


Abbildung 6: Inositausscheidung bei einem Gesunden nach p.o. Gabe von 15 g Inosit

Erläuterung zur Darstellung b):

1 mm² entspricht 2,7 mg Inosit

1 Std. entspricht 1,8 mm auf der Abszisse

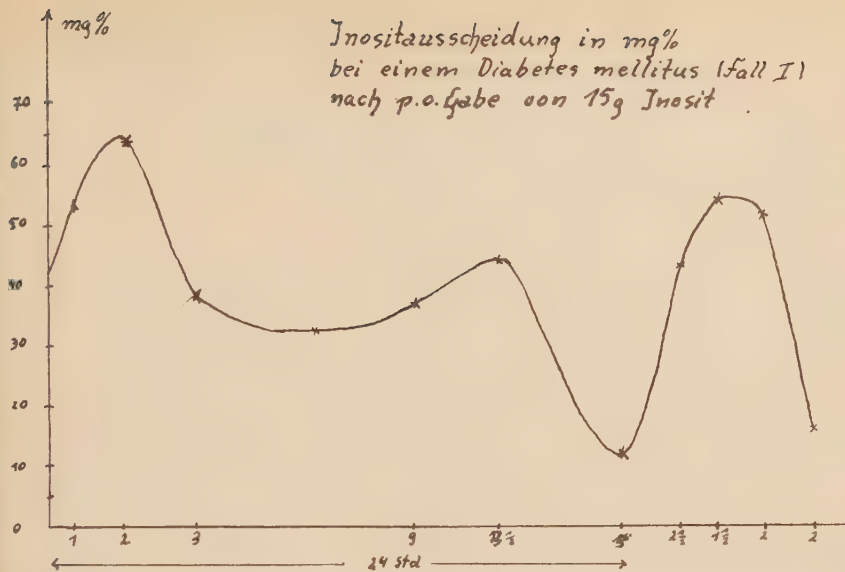


Abbildung 7

Gesamtinositausscheidung
bei einem Diabetes mellitus (Fall I)
nach p.o. Gabe von 15g Inosit

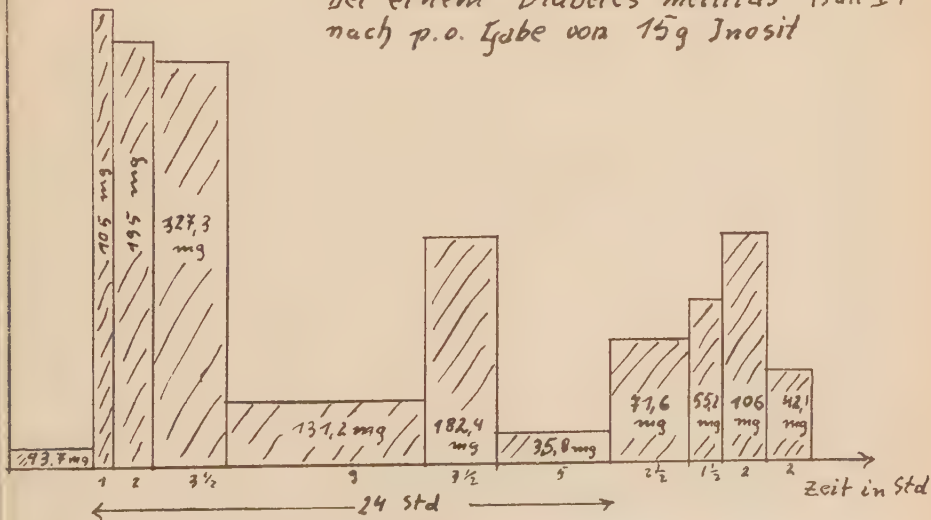


Abbildung 8: Inositausscheidung bei einem Diabetes mellitus nach p.o. Gabe von 15 g Inosit

In dieser Darstellung entsprechen

1 mm² = 2,2 mg Inosit

1 Std. = 3 mm auf der Abszisse

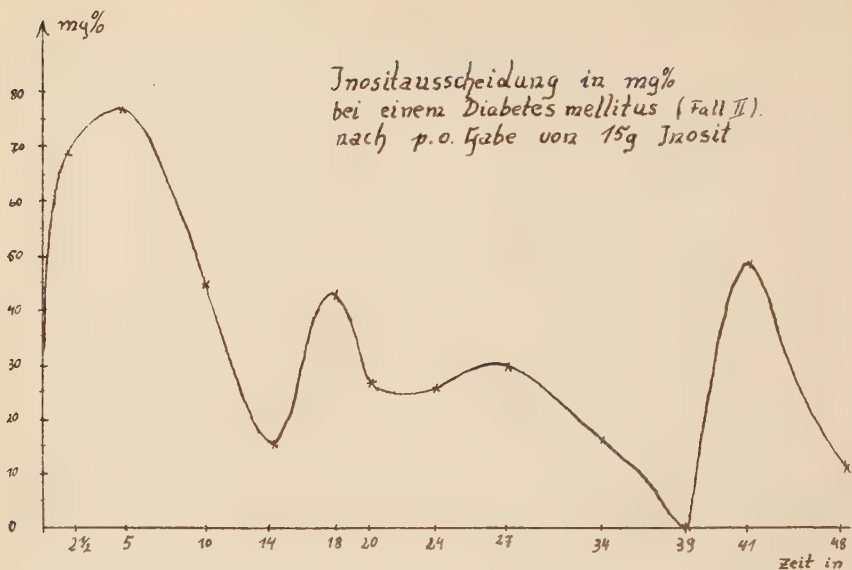


Abbildung 9

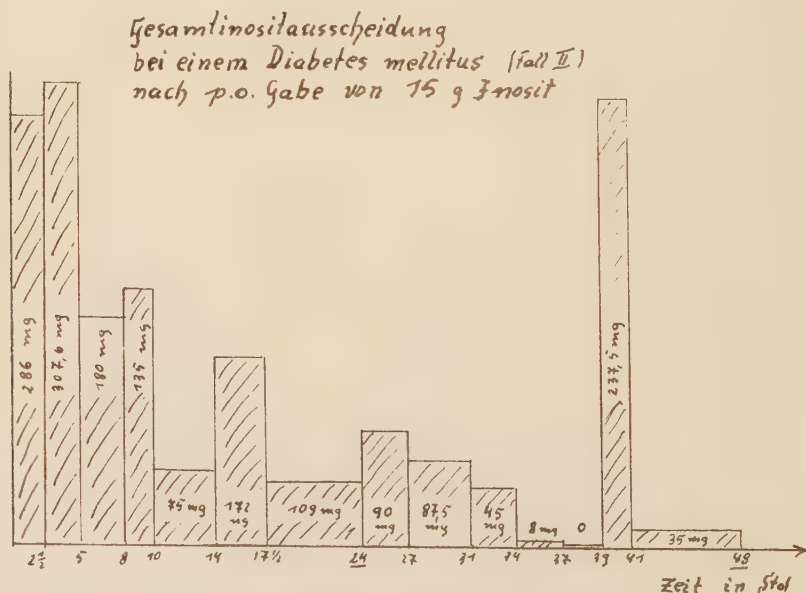


Abbildung 10: Inositausscheidung bei einem Diabetes mellitus nach p.o. Gabe von 15 g Inosit

Zur Erläuterung: 1 mm² entspricht 1,6 mg Inosit
1 Std. entspricht 2,6 mm auf der Abszisse

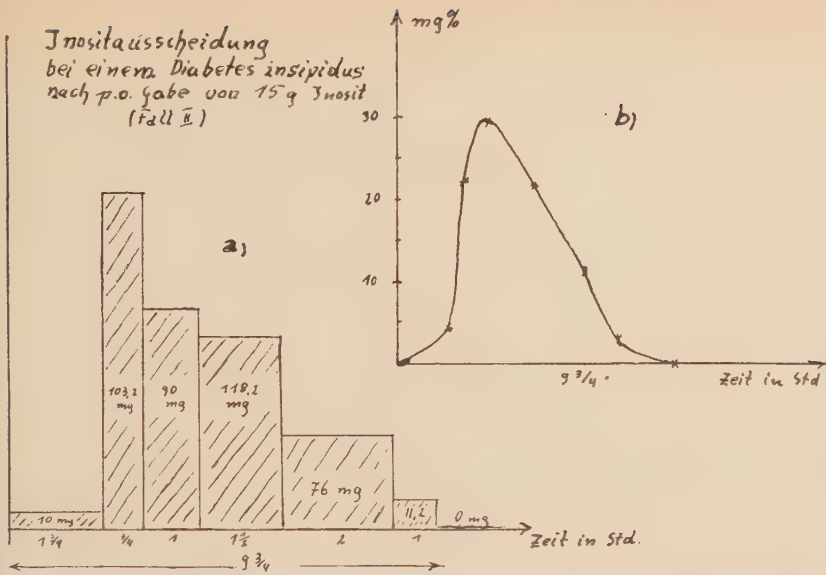


Abbildung 11: Inositausscheidung bei einem Diabetes insipidus nach p.o. Gabe von 15 g Inosit

Erläuterung zur Darstellung a):

1 mm entspricht 4,4 mg Inosit

1 Std. entspricht 10 mm auf der Abszisse

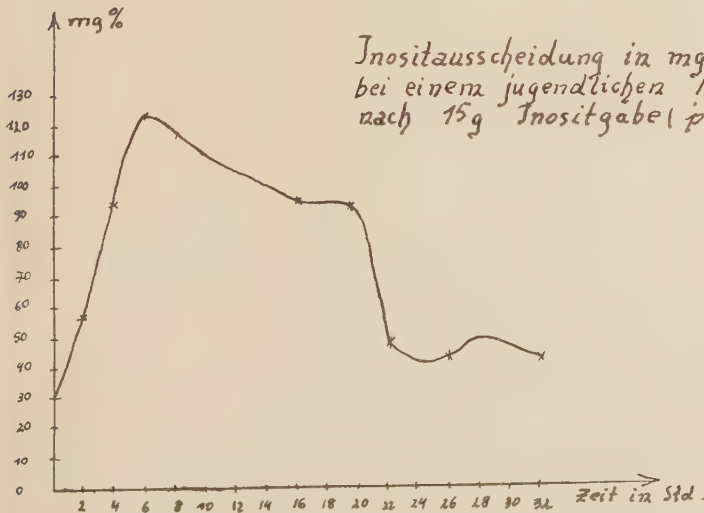


Abbildung 12

F. LITERATUR

- Baumgarten, F.: Dt. Zeitschrift für Nervenheilkunde, Bd. 177, 1958
Dt. Zeitschrift für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Bd. 15, Heft 4 - 5, 1955
- Böhm, P. und Richarz, G.: Hoppe-Seylers Z. d. physiol. Chem., 289, 110 - 120, 1954
- Cloetta, A.: Ann., 856, 99, 289
- Cochot: Journ. des Conn. Méd., (l.c. aus J. Pharm.Chim., 8, 28, 1883)
- Daughaday, W.H., Larner, E., Houghton, E.H.: Clin. Invest., 33, 1075-1080, 1954 u. 326-332, 1054 (l.c. aus Ronas, Ber. d. ges. Physiol., 174, 205, 1954)
- Fischer und Dörfel: Hoppe-Seylers Z. d. physiol. Chem., 297, 164, 1954
- Folch, I. und Woolley, D.W.: J. biol. Chem., 142, 963-964, 1942
- Fränkel, S.: Chem. Zentralblatt, 37, 167, 1896
- Gallois, N.: Thèse Doct. Med., Paris, 1864 (l.c. aus Fleury u. Balatre P., Les Inositols, Chimie & Biochimie, 1948)
- Georges, H.: Thèse Doct. Med., Paris (l.c. aus Fleury P. u. Balatre P., Les Inositols, Chimie & Biochimie, 1948)
- Herken, H., Maibauer, D. und Weygand, F.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., 233, 4, 301-310, 1958
- Hoppe-Seyler: Handbuch der chem. Analyse, 8. Auflage, Berlin 1909
- Hugouneq, L.: Technique de Laboratoire. Bd. Chimie Clinique, Paris, 1954 (l.c. aus Physiol. Chem., Flaschenträger und Lehnartz, 1957)
- Johnson, C.B., Mitchell, R.J. und Hamilton, S.: Arch. Biochem., 19, 32, 1948
- Külz, E.: Dissert. Marburg, Zentralblatt f. d. med. Wissenschaft, 550, 1876
- Larner, J., Jackson, W.T., Graves, D.J. und Stamer, J.R.: Arch. of Biochem. and Biophysics, 60, 352-363, 1956

- Leva, J.: Dt. Arch. klin. Med., 48, 15, 1881
- Mack, H., Mc Cormick und Harris, J.:
J. Nutrit., 52, 337-344, 1954 (l.c. aus Ronas, Ber.
d. ges. Physiol., 171, 148, 1954)
- Maquenne, L.: Ann. Chim. Phys., 12, 80, 1887, Soc. Bull. Chim.,
France, 47, 290, 1887 (l. c. aus Fleury P. und Balatre
P., Les Inositols, Chimie & Biochimie, 1948)
- Meillère und Camus, L.: C.R. Biol., 61, 159, 1906, (l.c. aus Beckmann, R.,
m-Inosit, 31, 1953)
- Meillère und Fleury: C.R. Biol., 67, 343, 1909 u. Tribune Mèd. Sept.
1909 (l. c. aus Fleury P. u. Balatre P., Les Inositols,
Chimie & Biochimie, 1948)
- Needham, I.: Biochem. J., 18, 841, 1924 u. 18, 1371, 1924 u.
13, 319, 1924
- Platt und Glock: Biochem. J., 37, 709-712, 1943
- Scherer, I.: Ann., 1850, 73, 322 u. I. prakt. Chem., 1850,
50, 32 u. 54, 405
- Starkenstein, E.: Z. physiol. Chem., 1909, 58, 162
- Stetten, H.R., Stetten, D. jr., Posternak, Th., Schopper, H.W. u. Reymond, D.:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. f. exp. Pathol. u.
Pharm., 233, 4, 301-310, 1958
- Tambach, R.: Pharm. Zentralblatt, 37, 16, 1896
- Voit, K. und Seckfort, H.: Münchner Med. Wochenschrift, 24, 680-681, 1953
- Wieland, H. und Wieshart, R.S.:
Ber. dt. Ges., 47, 2082, 1914
- Woolley, D.W.: Proc. exp. Med., 75, 277-284, 1942 (l.c. aus Fleury
u. Balatre P., Les Inositols, Chimie & Biochimie,
1948)

Herrn Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL möchte ich ergebenst danken für sein Entgegenkommen, das es mir ermöglichte, in seiner Klinik die Experimente zur vorliegenden Arbeit auszuführen.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr. A. BERNSMEIER und Herrn Dr. F. BAUMGARTEN für die Überlassung des Themas, letzterem ganz besonders für seine Ratschläge.

LEBENS LAUF

Ich, Wolfgang Pieter Kaas, wohnhaft in Strass bei Miesbach, wurde am 12.2.1935 in Bochum geboren als Sohn des Homöopathen Pieter Kaas und dessen verst. Ehefrau Charlotte, geb. Borch.

Nach dem Besuch von 4 Klassen Volksschule in Schliersee trat ich in die Städtische Oberrealschule Miesbach über.

Seit Erlangung des Reifezeugnisses im Jahre 1954 studierte ich an der Universität München Medizin. Ich bestand im März 1957 die ärztliche Vorprüfung und im Juni 1960 die ärztliche Prüfung.

